

УДК 577.24

©Коллектив авторов

## АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА К И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ В КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС OXYS ПРИ РАЗВИТИИ ОСТЕОПОРОЗА

*А.А. Венедиктова<sup>1\*</sup>, О.В. Фаламеева<sup>2</sup>, Н.Г. Колосова<sup>3</sup>, М.А. Садовой<sup>2</sup>,  
Т.А. Короленко<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Государственное учреждение научно-исследовательский институт физиологии Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук, ул. Тимакова, 4, 630117, Новосибирск; факс (383)332-42-54;

эл. почта: venediktovaa@bk.ru, T.A.Korolenko@iph.ma.nsc.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи, ул. Фрунзе, 17, 630091, Новосибирск; факс (383)224-55-70; эл. почта: OFalameeva@niito.ru

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук, пр. Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск; факс (383) 333-12-78; эл. почта: Kolosova@bionet.nsc.ru

Проведено сравнение активности органоспецифичной (для остеокластов) цистеиновой протеазы катепсина К и металлопротеаз в костной ткани преждевременно стареющих крыс OXYS и крыс Wistar. В возрасте 3 мес. - в период предшествующий манифестации у крыс OXYS остеопороза, активность катепсина К в костной ткани у них выше, активность матриксных металлопротеаз, напротив, ниже чем у крыс Wistar. У крыс Wistar к возрасту 14 мес. активность катепсина К возрастает, а металлопротеаз снижается. У крыс OXYS изменения с возрастом имели противоположную направленность. В результате в 14 мес. на фоне выраженного остеопороза - описанных нами ранее снижения минеральной плотности костной ткани и её резорбции, - межлинейные различия в активности матриксных металлопротеаз и катепсина К отсутствовали. Активность универсального ингибитора протеаз –  $\alpha_2$ -макроглобулина в была выше в сыворотке крови 14 мес. крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar того же возраста. Обсуждается роль активации катепсина К в резорбции костной ткани при развитии остеопороза.

**Ключевые слова:** катепсин К, матриксные металлопротеазы, резорбция костной ткани, преждевременно стареющие крысы OXYS, остеопороз.

**ВВЕДЕНИЕ.** Функционирование костной ткани тесно связано с активностью, по меньшей мере, двух типов клеток: остеобластов, ответственных за образование матрикса костной ткани, и остеокластов, отвечающих за резорбцию матрикса кости [1, 2]. Резорбция и биосинтез компонентов матрикса кости тесно взаимосвязаны, поскольку остеобласты влияют на активность остеокластов, на их генез посредством различных выделяемых ими факторов роста [3] и других сигнальных молекул [4]. В свою очередь, остеокласты стимулируют деятельность остеобластов [5]. Ремоделирование костной ткани в норме представляет собой сбалансированный процесс, нарушение которого приводит к развитию различных заболеваний, в том числе - остеопороза, заболевания, которое занимает одно из ведущих мест по распространенности и тяжести последствий для больного [6].

\* - адресат для переписки

Механизмы резорбции костной ткани и характер их изменений при развитии остеопороза остаются до конца не выясненными. Ключевую роль в процессе резорбции костной ткани играет катепсин К [5, 7]; предполагается, что он вовлечён в патогенез остеопороза различного генеза, в том числе - сенильного и развивающегося у женщин в постменопаузальном периоде [5, 7]. Важная роль в разрушении и ремоделировании тканей отводится матриксным металлопротеазам (ММП), однако сведения об их участии в резорбции кости весьма противоречивы. Установлено, что ММП-1,-2 продуцируются остеобластами [3, 8]. У мышей, нокаутированных по различным ММП, не обнаружено изменений резорбции кости [4] или найдены лишь незначительные кратковременные изменения в деградации костной ткани [3]. С другой стороны, на культуре остеокластов показано, что ММП-9 (желатиназа В) также необходима для резорбции костей черепа, как и катепсин К [8]. Вовлеченность изменений матриксных металлопротеаз в патогенез остеопороза изучена недостаточно.

Альфа-2-макроглобулин ( $\alpha_2$ -МГ) является одним из наиболее многофункциональных белков крови: он способен транспортировать различные цитокины, а также обладает свойством связывать и ингибировать все известные классы пептидаз [9]. Повышение концентрации  $\alpha_2$ -МГ в организме наблюдается при нефротическом синдроме, хронических артритах [9]. Повышение его концентрации при этих состояниях, длительных по времени, можно рассматривать как ответ организма на постоянное присутствие избыточного количества разнообразных протеаз в кровяном русле. Понижение концентрации  $\alpha_2$ -МГ наблюдается при поражениях поджелудочной железы, инфаркте миокарда, то есть тогда, когда пул активных молекул ингибитора расходуется на подавление активности протеаз: факторов свёртывания крови – при инфаркте, пищеварительных ферментов – при поражениях поджелудочной железы. При различных вариантах артритов у детей активность  $\alpha_2$ -МГ зависит от выраженности воспалительного процесса [9]. Комплексы  $\alpha_2$ -МГ с протеазами элиминируются из крови в течение 2 минут [10], поэтому активность  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке отражает ингибиторные возможности сыворотки крови и позволяет оценить при отклонении активности  $\alpha_2$ -МГ от нормы, хронический или острый характер носит патологический процесс, сопровождающийся избыточным выходом протеаз из клеток.

Целью настоящей работы явилось исследование активности катепсина К и матриксных металлопротеаз в костной ткани и антипротеазной активности  $\alpha_2$ -МГ сыворотки у крыс OXYS – генетической модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится развитие раннего остеопороза. Ранее мы показали, что у крыс OXYS прирост минеральной плотности костной ткани происходит медленнее и не достигает значений минеральной плотности костной ткани крыс Wistar соответствующего возраста. Более того, начиная с 6 месяцев, минеральная плотность костной ткани этих животных постепенно снижается по всем отделам скелета на фоне характерных для сенильного остеопороза изменений состава макро- и микроэлементов [11].

**МЕТОДИКА.** Работа выполнена на крысах-самцах линии OXYS в возрасте 3-х (молодые) и 14-ти месяцев (взрослые). Контролем служили крысы Wistar соответствующего возраста. Все животные получены из лаборатории разведения животных Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск. Животных содержали при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище – стандартному гранулированному корму ПК-120-1 (ООО “Лабораторснаб”, Россия). Количество животных в группах варьировало от 5 до 10 особей. Забой животных осуществляли под эфирным наркозом, извлекали позвонки поясничного отдела и немедленно помещали в жидкий азот. Позвонки очищали от мышечной ткани в криостате при  $-15^{\circ}\text{C}$  скальпелем и гомогенизировали при помощи агатовой ступки в растворе 0,25 М сахарозы, pH 7,3 при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Гомогенаты костной ткани хранили до определения активности ферментов при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для удаления неорганических солей перед определением активности ферментов

проводили диализ образцов против 0,2 М ацетатного буфера с ЭДТА pH 5,5 в течение 36 часов при +4°C с последующей обработкой в течение 1 часа 0,1% тритоном X-100 при +4°C.

Активность катепсина К в гомогенате кости определяли по методу, предложенному Бромме [12] с модификациями с использованием флуоресцентного субстрата Z-Gly-Pro-Arg-MCA (“Sigma”, США). После обработки тритоном X-100 образцы подвергались преинкубации с 0,1% (m/v) раствором папаина (“ICN”, США) в конечной концентрации в 100 мМ ацетатном буфере pH 5,5, содержащем 2,5 мкМ дитиотреитол в течение 30 минут при 37°C. Скорость гидролиза Z-Gly-Pro-Arg-MCA папаином в присутствии гомогената кости незначительна, и ею можно пренебречь.

Инкубационная смесь для определения активности катепсина К включала 0,1 мл гомогената костной ткани и 0,4 мл 5 мкМ раствора субстрата в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,5 с добавлением 2,5 мкМ дитиотреитола в присутствии 0,33 мкМ CA-074 – специфичного ингибитора катепсина В (любезно предоставлен проф. Катунума, Япония), 1 мМ фенилметилсульфотрида (PMSF), (“ICN”) - ингибитора сериновых протеаз, 5 мМ бензамидина – специфичного ингибитора тромбина (“ICN”), гепарина - ингибитора матриксных металлопротеаз в концентрации 30 ед/мл (“Белмедпрепараты”, Белоруссия). Реакцию останавливали 2 мл 0,1 М хлорацетата в 0,1 М ацетатном буфере pH 14,3 на 0,5 мл инкубационной смеси.

Общую активность ММП оценивали по методу Nagase [13], используя флуоресцентный субстрат MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-DpA-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (“American Peptide Co”, США). Гомогенаты преинкубировали с папаином, как описано выше, после чего ингибировали цистеиновые протеазы добавлением в образцы 10 мкМ E-64. Инкубацию образцов проводили в течение 1 часа. Инкубационная смесь включала 0,03 мл гомогената костной ткани и 0,33 мл 1,25 мкМ раствора субстрата в TCN-буфере, pH 8,0, включавшем в себя 50 мМ трис-HCl, 0,15 М NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,05% (m/v) Brij-35 в присутствии 0,33 мкМ CA-074, 1 мМ PMSF. Реакцию останавливали 3 мл раствора 10 мМ ЭДТА на 0,3 мл инкубационной смеси.

Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 (Япония) при длинах волн возбуждения и эмиссии 355 и 460 нм, соответственно для измерения активности катепсина К и 320 и 390 нм для измерения активности ММП. Активность катепсина К выражали в нмоль МСА (метилкумариламида)/мин на 1 мг белка, общую активность ММП - в мкмоль МСА/мин на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [14].

Сыворотку крови получали центрифугированием образцов в течение 20 мин при 900 g. Концентрацию кальция в сыворотке крови определяли колориметрическим методом с использованием арсеназо-III (набор “Вектор-Бест”, Россия), измерения экстинкции проводили при 650 нм. Концентрацию фосфора в сыворотке крови определяли с использованием молибденовокислого аммония (набор Вектор-Бест, Россия) при 360 нм.

Активность  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови крыс определяли по остаточной активности трипсина, против бензоил-аргинин-этилового эфира (“Sigma”) после обработки пробы ингибитором трипсина из бобов сои (“Sigma”) в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 8,0 в соответствии с методом Яровой с модификациями [15]. Оптическую плотность измеряли при 253 нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО); результаты выражали в единицах ингибиторной активности в расчете на 1 мл.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программного продукта STATISTICA 6.0. Для определения достоверности различий выбран непараметрический критерий Манна-Уитни, угловое преобразование Фишера. Для определения влияния на изучаемые параметры фактора генотипа крыс и возраста был применен непараметрический факторный анализ Крускала-Уоллеса. Для выявления корреляционных отношений применён критерий Спирмена. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## ПРОТЕАЗЫ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Активность катепсина К в костной ткани у крыс Wistar и OXYS.*

В костной ткани позвонков 3 месячных крыс OXYS активность катепсина К, основной цистеиновой протеазы остеокластов, была в 2,1 раза выше (табл. 1), чем у крыс Wistar того же возраста, что говорит об активном разрушении костной ткани остеокластами. Альтернативный дисперсионному анализу непараметрический однофакторный анализ (ANOVA Крускала-Уоллеса) подтвердил, что фактор принадлежности крыс к линии OXYS обуславливает повышенный уровень активности катепсина К ( $H=4,2$ ,  $p<0,05$ ) у животных этого возраста.

*Таблица 1.* Активность катепсина К (нмоль/мин на 1 мг белка) и ММП (мкмоль/мин на 1 мг белка) в костной ткани позвоночника и их сывороточного ингибитора  $\alpha_2$ -МГ (ед./мл) у крыс Wistar и OXYS разного возраста. Данные представлены как  $X \pm SEM$ .

Изучаемый параметр	Wistar		OXYS	
	3 месяца	14 месяцев	3 месяца	14 месяцев
Активность катепсина К	0,74±0,11 n=5	1,21±0,17* n=8	1,58±0,39* n=8	1,09±0,16 n=10
Активность ММП	29,29±5,95 n=5	21,46±3,18 n=7	10,12±1,57* n=5	21,60±3,79# n=8
Активность $\alpha_2$ -МГ	4,08±0,21 n=9	4,09±0,31 n=8	4,54±0,48 n=10	4,89±0,40^ n=9

Примечание: \* -  $p<0,05$  по сравнению с крысами Wistar в 3 месяца; # -  $p<0,05$  по сравнению с крысами OXYS в 3 месяца; ^ -  $p<0,05$  по сравнению крысами Wistar того же возраста.

На сегодняшний день денситометрическое исследование костной ткани является стандартом в диагностике остеопороза [6]. Поскольку по данным денситометрии у 3 месячных крыс OXYS снижение минеральной плотности костной ткани еще не выявляется [6], можно сделать вывод, что развитие остеопороза у крыс этой линии предваряется повышением активности катепсина К в костной ткани. Дальнейшее развитие остеопороза у крыс OXYS, по данным морфологического исследования костных фрагментов позвонков, связано со снижением функций остеобластов [6].

С возрастом активность катепсина К у крыс Wistar (табл. 1) увеличивалась в 1,6 раза ( $H=4,2$ ,  $p<0,05$ ). К 14 месяцам активность катепсина К у крыс OXYS оставалась на том же уровне, что и у 3 месячных животных и соответствовала активности у 14 месячных крыс Wistar. Факт увеличения активности катепсина К в костной ткани у крыс Wistar с возрастом до значений, характерных для крыс OXYS аналогичного возраста при том, что остеопороз у крыс Wistar не развивается [6], может свидетельствовать о том, что с возрастом ремоделирование костной ткани в позвоночнике идет интенсивнее.

*Концентрация кальция и фосфора в сыворотке крови у крыс Wistar и OXYS.*

Повышение активности катепсина К у молодых крыс OXYS сопровождается повышением концентрации кальция и фосфора в сыворотке крови по сравнению с крысам Wistar на 21% и 23% соответственно (табл. 2). К мобилизации кальция и

фосфора из костной ткани может приводить высокая скорость костного обмена [16], характерного для критического периода роста, в ходе которого несколько снижается деятельность остеобластов и увеличивается активность остеокластов [17]. Не исключено, что у крыс OXYS в возрасте 3 месяца, соответствующего критическому периоду роста, нарушаются процессы, приводящие в дальнейшем к нормализации ремоделирования костной ткани, и, таким образом, за критическим периодом роста следует развитие остеопороза. Очевидно, что у крыс OXYS резорбция костной ткани остеокластами в возрасте 3 мес. не прекращается, как того следовало бы ожидать при ремоделировании в норме.

Таблица 2. Концентрация кальция и фосфора (ммоль/л) в сыворотке крови у крыс Wistar и OXYS разного возраста. Данные представлены как  $X \pm SEM$ .

Изучаемый параметр	Wistar		OXYS	
	3 месяца	14 месяцев	3 месяца	14 месяцев
Концентрация кальция	2,64±0,11 n=6	2,65±0,10 n=7	3,20±0,07** n=8	2,63±0,08### n=6
Концентрация фосфора	2,35±0,36 n=6	2,44±0,10 n=7	2,89±0,12* n=8	2,70±0,18 n=6

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  по сравнению крысами Wistar того же возраста; ### -  $p < 0,01$  по сравнению с крысами OXYS в 3 месяца.

С возрастом концентрация кальция у крыс Wistar не изменялась, а у крыс OXYS снижалась ( $H=8,82$   $p < 0,01$ ) до уровня концентрации кальция у крыс Wistar аналогичного возраста (табл. 2). Концентрация фосфора не изменялась с возрастом ни у крыс Wistar, ни у крыс OXYS (табл. 2).

*Активность металлопротеаз в костной ткани у крыс Wistar и OXYS.*

У 3 месячных крыс OXYS активность металлопротеаз была на 66% ниже, чем у крыс Wistar того же возраста ( $H=5,77$   $p < 0,05$ ), а в 14 мес. межлинейные различия отсутствовали (табл. 1). Таким образом, динамика изменения активности ММП в костной ткани у животных разного генотипа была разнонаправленной: у крыс OXYS в период с 3-х до 14-ти мес. активность металлопротеаз в костной ткани увеличивалась вдвое ( $H=6,19$ ,  $p < 0,05$ ), а у крыс Wistar несколько снижалась, но влияние возраста на этот показатель у них не было достоверным. Тем не менее, применение углового преобразования Фишера позволило выявить достоверные различия в активности металлопротеаз в костной ткани между 3-х и 14-ти месячными крысами Wistar.

ММП играют двойственную роль в ремоделировании костной ткани: выделяясь остеокластами, они совместно с катепсином К участвуют в резорбции [8], однако их выделяют и остеобласты перед началом биосинтеза матрикса костной ткани [18]. Возможно, что ММП необходимы для обнажения органических компонентов матрикса, к которым прикрепляются остеобласты через рецепторы, находящиеся на их мембранах.

Корреляционный анализ выявил отрицательную корреляцию между концентрацией кальция в сыворотке крови и активностью ММП в костной ткани у крыс ( $r=-0,69$ ,  $p < 0,02$ ), что может говорить о том, что за усиление резорбции костной ткани, вызывающей повышение кальция в сыворотке крови у крыс, ответственны не матриксные металлопротеазы. Кроме того, этот факт позволяет

## ПРОТЕАЗЫ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

предположить, что роль ММП костной ткани позвоночника связана в большей степени с внедрением в ткань остеокластов, чем с резорбцией. Исследования остеокластов, культивируемых на коллагене и костном матриксе, показали, что при обработке культуры, культивируемой на коллагене ингибиторами металлопротеаз RP59794, BV94, ТИМП-1, наблюдается резкое снижение способности остеокластов к инвазии. Кроме того, неминерализованный коллаген гораздо медленнее подвергался расщеплению металлопротеазами, по сравнению с минерализованным матриксом кости [19].

Исходя из этого, высокий уровень активности ММП в костной ткани у молодых крыс Wistar может свидетельствовать, во-первых, о достаточном функционировании остеобластов, во-вторых, - о высокой способности клеток костной ткани к прикреплению. Низкий уровень активности катепсина К и высокий уровень активности ММП в костной ткани 3-месячных крыс Wistar свидетельствуют о том, что активное формирование полноценной пиковой массы костной ткани обеспечивается у них достаточным количеством и активностью остеобластов и достаточным количеством и относительно низкой активностью прикрепившихся остеокластов.

Снижение активности металлопротеаз в костной ткани у крыс Wistar с возрастом может быть связано со снижением деятельности остеобластов и уменьшением способности к прикреплению как остеобластов, так и остеокластов. При этом остеокласты, судя по повышению активности катепсина К, становятся активнее. Возможно, это связано с необходимостью ремоделирования большего объема костной ткани в этом возрасте.

У крыс OXYS наблюдается другая картина: низкая активность металлопротеаз в костной ткани может отражать как недостаточную активность и способность к прикреплению остеобластов, так и недостаточное количество прикрепившихся остеокластов. Возможно, в связи с этим, судя по высокой активности катепсина К, остеокласты становятся активнее. По достижению 14-ти месячного возраста крысами OXYS в костной ткани увеличивается активность металлопротеаз, вероятно, из-за сложности прикрепления остеокластов в связи с деминерализацией костного матрикса, обусловленной как действием самих остеокластов, так и повышением содержания дерматансульфата в костной ткани [20]. Таким образом, роль катепсина К в развитии остеопороза у крыс OXYS очевидна: его повышенная активность предваряет развитие остеопороза, а также не дает возможности для нормализации процесса ремоделирования, сдвигая равновесие в сторону резорбции. При этом повышенная активность катепсина К скорее связана с активностью остеокластов, чем с их количеством. Роль же металлопротеаз в развитии остеопороза, вероятнее всего, связана с миграцией и прикреплением клеток.

*Активность  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови у крыс Wistar и OXYS.*

Колебания активности исследуемых ферментов костной ткани не отражались на активности ингибитора протеаз широкого спектра  $\alpha_2$ -МГ у крыс Wistar: его активность в сыворотке крови не различается у животных разного возраста. У крыс OXYS, напротив, - наблюдалась тенденция к её повышению. Несмотря на то, что активность катепсина К и ММП в костной ткани крыс у Wistar и OXYS в возрасте 14 месяцев не различаются, у зрелых крыс OXYS увеличивается активность  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови на 20% по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (табл. 1), что указывает на постоянное присутствие избытка протеаз в кровяном русле у крыс OXYS при достижении ими 14-ти месяцев.

У 3 месячных крыс Wistar обнаружена высокая отрицательная корреляция между активностью металлопротеаз (но не катепсина К) в позвонках и активностью  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови ( $r = -0,97$ ,  $p < 0,01$ ). Это может быть связано с влиянием интерлейкина-1, который усиливает экспрессию  $\alpha_2$ -МГ в печени [21] и активность остеокластов в костной ткани за счёт увеличения экспрессии ММП и катепсина L [21, 22]. Кроме того, эта корреляционная связь может быть обусловлена расходом пула активных молекул  $\alpha_2$ -МГ вследствие их связывания

с молекулами ММП, что обеспечивает ингибирование активности последних. Возможно также, что будучи наилучшим субстратом для ММП-1 [23],  $\alpha_2$ -МГ подвергается протеолизу.

У 14 месячных крыс Wistar отрицательная корреляция ( $r = -0,78$ ,  $p < 0,05$ ) была выявлена между активностью катепсина К в костной ткани и активностью  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови. Таким образом, у крыс Wistar активность  $\alpha_2$ -МГ остается неизменной, но при этом можно предположить, что пул активных молекул  $\alpha_2$ -МГ расходуется в молодом возрасте на ингибирование металлопротеаз, а в зрелом – на ингибирование катепсина К.

Выявленная нами у крыс Wistar корреляция между протеазами в костной ткани и активностью  $\alpha_2$ -МГ в сыворотке крови у крыс ОХYS отсутствовала. Не исключено, что  $\alpha_2$ -МГ у них может быть израсходован на коррекцию процессов, сопровождающихся усилением активности протеаз, источником которых могут быть другие органы и ткани. Ранее мы показали, что в печени крыс ОХYS активность протеаз на отдельных этапах онтогенеза повышена [24]. Поскольку комплекс, образованный протеазами и  $\alpha_2$ -макроглобулином, способствует необратимому связыванию и элиминации трансформирующего фактора роста  $\beta$  [25], ингибирующего апоптоз остеобластов и запускающего апоптоз остеокластов [16], можно предположить, что увеличение активности протеаз в сыворотке крови является одним из механизмов, способствующих развитию остеопороза у крыс ОХYS.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Несмотря на то, что патогенез остеопороза активно изучается, его патогенетические механизмы во многом не установлены. Крысы ОХYS с признаками рано развивающегося сенильного остеопороза [6, 11] являются перспективной моделью для исследования этого заболевания. Главная роль в развитии остеопороза, по мнению ряда исследователей, принадлежит катепсину К – цистеиновой протеазе остеокластов [5, 7], обладающей высокой активностью в отношении белков матрикса кости [1]. Наша работа показала, что несмотря на выраженные проявления остеопороза: сниженную минеральную плотность костной ткани и её резорбцию [6], общая активность металлопротеаз и катепсина К в костной ткани в 14 мес. у крыс Wistar и ОХYS была одинаковой. Вероятно, различия в активности этих ферментов, отражающих деятельность клеток костной ткани у крыс Wistar и ОХYS, более значимы в ранний период, когда происходит наработка пиковой массы скелета. Таким образом, нами показана важность адекватной активности ферментов костной ткани в процессе её ремоделирования на определенных стадиях роста и развития и необратимость патологического процесса, развивающегося вследствие резкого изменения активности протеаз, принимающих участие в ремоделировании кости.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант 08-04-00722.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Yasuda Y., Kaleta J., Bromme D. (2005) *Advanced Drug Deliver Reviews*, **57**, 973–993.
2. Yamashita D., Dodds R.A. (2000) *Curr. Pharmaceut. Des.*, **6**, 1–24.
3. Vaananen H.K., Zhao H., Mulari M., Halleen J.M. (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 337–381.
4. Hou P., Troen T., Ovejero M.C., Kirkegaard T., Andersen T.L., Byrjalsen I., Ferreras M., Sato T., Shapiro S.D., Foged N.T., Delaisse J.M. (2004) *Bone*, **34**, 37–47.
5. Buhlung F., Rocken C., Brasch F., Hartig R., Yasuda Y., Saftig P., Bromme D., Welte T. (2004) *Amer. J. Pathol.*, **164**, 2203–2216.

ПРОТЕАЗЫ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

6. Фаламеева О.В., Садовой М.А., Храпова Ю.В., Колосова, Н.Г. (2006) Хирургия позвоночника, **1**, 88–94.
7. Buhlung F., Groneberg D., Welte T. (2006) Current Drug Targets, **7**, 751–759.
8. Everts V., Korper W., Jansen D.C., Steinfort J., Lammerse I., Heera S., Docherty A.J.P., Beertsen W. (1999) FASEB J., **13**, 1219–1230.
9. Ярыгина Е.С. (2005) Клинико-диагностическое значение активности матриксных металлопротеаз и лизосомальных ферментов при артритах у детей. Дисс. канд. мед. наук, Институт физиологии СО РАМН, Новосибирск.
10. Riely G.J., Rachmilewitz J., Koo P.H., Tykocinski M.L. (2000) Biochem. J., **351**, 503–508.
11. Gonchar A., Kolmogorov U., Gladkih E., Shuvaeva O., Beisel N., Kolosova N. (2005) Nucl. Instr. Meth. Phys. Res., **543**, 271–273.
12. Lecaille F., Kaleta J., Bromme D. (2002) Chem. Rev., **102**, 4459–4488.
13. Nagase H., Fields C.G., Fields G.B. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 20952–20957.
14. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem. **72**, 248–254.
15. Толочко З.С., Спиридонов В.К. (2006) Росс. Физиол. Журн., **92**, 1078–1084.
16. Беневоленская Л.И. (2003) Руководство по остеопорозу, БИНОМ. Лаборатория знаний, Москва, 524 с.
17. Баранов А.А., Щеплягина Л.А., Баканов М.И., Васильева Е.М., Мусеева Т.Ю., Алатырцев В.В., Чибисов И.В., Пинелис В.Г., Арсеньева Е.Н., Богатырева А.О., Герасимова Ю.В., Баканова Т.Д. (2002) Медицинский научный и учебно-методический журнал, **6**, 131–148.
18. Li Z., Hou W-S., Escalante-Torres C.R., Gelb B.D., Bromme D. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 28669–29676.
19. Sato T., Taekker N., Dalaisse J.-M. (1998) J. Bone. Miner. Res., **13**, 59–65.
20. Ершов К.И., Русова Т.В., Фаламеева О.В., Садовой М.А., Айзман Р.И. (2006) Вестник НГУ Сборник научных работ студентов и молодых учёных, **8**, 60–64.
21. Furiyama N., Fujisawa Y. (2000) Endocr. Res., **26**, 189–204.
22. Hill P.A., Murphy G., Docherty A.J., Hembry R.M., Millican T.A., Reynolds J.J. (1994) J. Cell. Sci., **107**, 3055–3064.
23. Соловьева Н.И. (1996) Биоорган. химия, **24**, 217–226.
24. Венедиктова А.А., Фаламеева О.В., Колосова Н.Г., Садовой М.А., Короленко Т.А. (2007) Бюл. СО РАМН, **3**, 127–132.
25. Рансбергер К. (2003) В сб.: Опыт и перспективы системной энзимотерапии, Фада ЛТД, Киев, **1**, с. 5–18.

Поступила: 03. 06. 2008.

**CATHEPSIN K AND MATRIX METALLOPROTEASES ACTIVITY IN BONE TISSUE OF OXYS RATS WITH OSTEOPOROSIS DEVELOPMENT**

*A.A. Venediktova<sup>1</sup>, O.V. Falameeva<sup>2</sup>, N.G. Kolosova<sup>3</sup>, M.A. Sadovoj<sup>2</sup>, T.A. Korolenko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Physiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Timakova 4, Novosibirsk, 630117 Russia; fax: (383)332-42-54; e-mail: venediktovaa@bk.ru

<sup>2</sup>Federal State Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Federal Agency of Medical High Technology Assistance, ul. Frunze 17, Novosibirsk, 630091 Russia

<sup>3</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Lavrentjeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

The comparative study of activity of cysteine protease cathepsin K and matrix metalloproteases (MMPs) in bone tissue of accelerated senescent OXYS rats with early ageing comparatively to Wistar rats of the same age was performed. Early development osteoporosis is a typical feature of OXYS rats. In bone tissue of 3 month old OXYS rats, before appearance of osteoporosis manifestation cathepsin K activity was higher, whereas MMPs activity was lower than in Wistar rats. In Wistar rats (3 and 14 months old) cathepsin K activity of spine was shown to increase, and MMPs activity to decrease. In OXYS rats age-related change of cathepsin K and MMPs activity in bone tissue had the opposite direction. As a result of this there were no differences between Wistar and OXYS rats 14 months old despite the marked osteoporosis in OXYS rats as revealed our early researches. Serum  $\alpha_2$ -macroglobulin activity was higher in 14 months old OXYS rats. The role of activation of cathepsin K in bone resorption in the development of osteoporosis in early ageing OXYS rats is discussed.

**Key words:** cathepsin K, matrix metalloproteases, bone resorption, early ageing OXYS rats, osteoporosis irreversibility.